

3.2 Methoden

3.2.1 Bestimmung der Telomeraseaktivität

Der standardmäßig verwendete Nachweis der Telomeraseaktivität ist der TRAP-Assay - telomeric repeat amplification assay -, welcher von Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1994) beschrieben wurde. Das Prinzip des TRAP-Assays beruht auf dem indirekten Nachweis der von der Telomerase im Reagenzgefäß neu synthetisierten Wiederholungssequenzen. Für den Nachweis werden Proteinlysate von Zellkulturen oder Geweben mit noch intakter Telomerase benötigt. Der Assay besteht aus dem Elongationsschritt der Telomerase und einer anschließenden Amplifikation der Telomeraseprodukte über eine PCR. Zuerst synthetisiert die Telomerase aus dem Lysat Telomerasequenzen an den TS-Primer, welcher ein künstliches Telomere darstellt, diese werden im zweiten Schritt mit Hilfe des telomerspezifischen und markierten CX-Primers in einer PCR vervielfältigt. Durch die repetitive Struktur der Telomere kommt es zur Bildung von verschiedenen großen, jeweils 6bp unterschiedlichen PCR-Produkten. In der Gelelektrophorese erscheint deswegen ein leiterartiges Bild. In der Arbeit wurden drei verschiedene Verfahren, Radioaktiv-, Fluoreszenz- und Digoxigeninmarkierung, für die Produkte des TRAP-Assays verwendet, deren Detektion unter den folgenden Punkten erläutert wird.

3.2.1.1 Probenvorbereitung

Für die Telomeraseaktivitätsbestimmung werden ca. 5×10^5 Zellen von Zellkultur- und Gewebeproben benötigt. Zellen aus den Zellkulturen wurden nach Trypsinbehandlung zweimal mit PBS gewaschen, kurz zentrifugiert und das Pellet anschließend mit dem CHAPS-Puffer (3-[(cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) aus dem Telomerase-PCR-ELISA Kit (Roche Diagnostics) für 30 min auf Eis lysiert. Danach wurden die Lysate für 30 min bei 55 000 rpm bei 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert, der Überstand im flüssigen Stickstoff schockgefroren und sofort bei -80°C gelagert. Für die Telomeraseaktivitätsbestimmung in Gewebeproben wurde von frischen OP-Material mit Hilfe des Mikrotoms 5-10 20 µm starke Gewebeschnitte angefertigt, die in einem Röhrchen gesammelt und sofort lysiert wurden. Zur morphologischen Korrelation wurden vor und nach Abnahme der Schnitte zur Gewebeaufarbeitung jeweils zwei Gefrierschnitte vom Gewebeblock angefertigt, die fixiert und anschließend mit Hämatoxylin & Eosin gefärbt wurden.

Die Telomeraseaktivitätsbestimmung kann nur dann zu vergleichbaren Ergebnissen führen, wenn gleiche Proteinmengen verwendet werden. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein modifizierter Proteinnachweis nach LOWRY, das DC Proteinassay (BioRad),

eingesetzt. Hierfür wurden 5 µl Proteinlysate mit 25 µl Lösung A (alkalische Kupferartrat-Lösung) und 200 µl Lösung B (Folinreagenz) in einer Mikrotiterplatte zusammen pipettiert. Zusätzlich wird eine Proteineichkurve, bestehend aus 5 verschiedenen bekannten Proteinkonzentrationen, in jeder Bestimmung mitgeführt. Die Messung der Farbreaktion findet nach ca. 15 min in einem Photometer bei 630 nm statt. Für den TRAP-Assay werden zum Vergleich der Telomeraseaktivität der Proben gleiche Konzentrationen eingesetzt.

3.2.1.2 TRAP-Assay

Abhängig von der Fragestellung und der zu erwartenden Aktivität wurden zwischen 0,03 µg und 6 µg Protein zusammen mit 20 mM Tris HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 63 mM KCl, 0,0005 % Tween-20, 1 mM EGTA, 50 µM dNTPs, 0,1 µg TS-Primer, 1 µg Spermidin und 0,1 mg/ml BSA (bovine serum albumin) bei 25 °C für 30 Minuten inkubiert. Für die Amplifikation wurden anschließend 2,5 U Taq-DNA Polymerase und 0,1 µg CX-Primer auf ein Volumen von 50 µl hinzugegeben und die PCR für 33 Zyklen bei 94°C für 30 s, 50°C für 30 s, and 72°C für 90 s in einem PCR-Gerät durchgeführt. Durch vorherige Behandlung der Proben mit 1 µg/µl RNase oder einer Hitzebehandlung für 30 min bei 90°C wurden Negativproben ohne Telomeraseaktivität generiert, die in jedem Assay mitgeführt wurden. Zur positiven Kontrolle der PCR-Reaktion wurden in jede Reaktion 5 amol eines 212 bp internen Standard beigefügt, der von Dr. Thomas Emrich (Roche Diagnostics, Penzberg) freundlich zur Verfügung gestellt wurde. Der interne Standard besitzt Sequenzen des CAT-Gens, die mit Bindungsstellen für den TS und CX-Primer flankiert sind.

3.2.1.3 Analyse der TRAP-Assay Produkte

Die Bestimmung der Telomerase wurde nach der PCR-Reaktion mittels gelelektrophoretischer Auftrennung und Detektion der PCR-Produkte durchgeführt. Standardmäßig wurde die PCR mit fluoreszenz-markierten Primern und anschließender Detektion der PCR-Produkte auf einem ABI 377 Sequenzer durchgeführt. Hierbei wurde während der PCR der Fluoreszenz-markierte Primer CX eingebaut und die Produktgröße auf dem ABI 377 Sequenzer mit einem Laser detektiert.

Zur Trennung der TRAP-Produkte wurde ein 36 cm langes 4,5 %iges Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff verwendet.

Gellösung:	18 g Harnstoff
	7,5 ml 30 %ige Acrylamidlösung
	6,0 ml 10 x TBE Puffer
	23,0 ml bidest. Wasser
	15 µl TEMED
	233 µl 10 %ige APS-Lösung

Für den Probenauftrag wurden 3 µl des TRAP-Assays mit 2 µl Formamid/25mM EDTA; pH 8,0, 0,6 µl Rox-Standard und 0,6 µl Loading Puffer gemischt und für 4 min bei 94°C denaturiert. Die Proben im Gel wurden mit 1 x TBE zwei Stunden bei 2700 V aufgetrennt. Für den Lauf wurde das Run-Modul 4 x A 3600 der Data Collection 2.1-2.6 Software des ABI 377 Sequenzers genutzt.

Zur Auswertung wurde das Programm der GeneScan Analysis 3.1.2 von ABI verwendet. In diesem Programm wird für jede Probe ein Elektropherogramm generiert, wobei nach Abgleichung mit dem internen Standard die Länge der Produkte in Basenpaaren und die Stärke der Fluoreszenz aufgezeichnet wird. Eine Probe mit hoher Telomeraseaktivität zeigt daraufhin das leiterartige Bild mit einer Anzahl von 15 bis 20 Peaks im Abstand von 6 bp, beginnend mit einer Produktgröße von 36 bp. Eine Quantifizierung der Telomeraseaktivität wurde durch Integration der Kurven vorgenommen, welche automatisch vom Programm durchgeführt wird. Die Summe der Flächeninhalte wird anschließend mit dem internen Standard normalisiert. Die normalisierte Telomeraseaktivität wird in units angegeben.

$$\text{Relative Telomeraseaktivität (RTA) in [units]} = \frac{\text{(Flächeninhalt der Telomerase Aktivität der Probe/Flächeninhalt des internen Standards)}}{\mu\text{g Protein}}$$

Für die im Labor von Dr. M. Blasco in Madrid durchgeführten TRAP-Assays wurden die Produkte radioaktiv markiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele getrocknet und die markierten Produkte über die Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Im kommerziell erhältlichen Telomerase-PCR-ELISA Kit werden die Produkte nach der Reaktion des TRAP-Assays mittels einer Digoxigenin-markierten Sonde detektiert. Die Detektion wurde nach einem Standardprotokoll für die ELISA-Detektion von PCR-Produkten durchgeführt. Die genaue Beschreibung ist unter Punkt 3.2.1.3 nachzulesen. Die Absorption der Farbreaktion wird bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Zur Auswertung werden die Werte der negativ Kontrollen von den Werten der Proben subtrahiert. Proben sind telomerase-positiv, wenn die Differenz der Absorption höher als 0,2 units ist.

Um eine Veränderung der Telomeraseaktivität nachzuweisen und Inhibitoren im Proteinlysat gering zu halten, wurden die für den TRAP-Assay eingesetzten Proteinkonzentrationen bis an die Nachweisgrenze verringert. Bis zu einer Menge von 0,03 µg Protein konnte in dem Nachweis auf dem ABI 377 Sequenzer Telomeraseaktivität gemessen werden. Ideale Konzentration war für die Nierenkarzinomzelllinien und Gewebe 0,3 µg Protein.

Proteinkonzentrationen von 0,3 µg, 0,06 µg und 0,03 µg zeigten eine lineare Abhängigkeit zur Telomeraseaktivität.

3.2.2 Bestimmung der Telomerlänge

Für die Bestimmung der Telomerlängen wurden von uns unterschiedliche Methoden verwendet. Einerseits wurde die mittlere Telomerlänge mittels der standardmäßig verwendeten TRF-Analyse (telomere restriction fragment) (Mehle *et al.*, 1994) bestimmt und andererseits eine neuere Methode, die Flowzytometrieanalyse nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Flow-FISH) (Rufer *et al.*, 1998) angewendet.

Bei der TRF-Analyse wird die Länge der terminalen Restriktionsfragmente bestimmt, welche aus der Telomer-DNA (TTAGGG) und Subtelomersequenzen bestehen. Das Prinzip beruht auf einer Hybridisierung der Telomersequenzen mit einer Sonde für TTAGGG. Hierfür wird nach Spaltung der DNA eine Southernblot-Hybridisierung mit einer markierten Telomersonde durchgeführt. Durch eine Restriktionsenzymsspaltung der DNA mit einem Enzym, wie Mlu I oder Rsa I, welche eine 4 Basen-Erkennungssequenz besitzen, wird die DNA in Bruchstücke kleiner als 100 bp, welche keine Schnittstellen für die verwendeten Restriktionsenzyme mehr besitzen, zerlegt. Die Länge der ungeschnittenen DNA ist abhängig vom Abstand der Telomersequenzen von der nächsten Restriktionsschnittstelle. Die mittlere Länge der terminalen Restriktionsfragmente wurde nach Hybridisierung und Detektion visuell durch Vergleich mit dem Größenmarker und densitometrisch mit der Software SCANPACK® (Biometra) bestimmt.

Eine technisch aufwendigere, jedoch schnelle und quantifizierbare Methode, die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), ist im Labor von Dr. M. Blasco in Madrid etabliert. Der Nachweis der Telomersequenzen über die Hybridisierung einer fluoreszenzmarkierten Sonde direkt an den Chromosomen hat den Vorteil der direkten Messung der eigentlichen Telomersequenzen. Im Gegensatz zur Bestimmung der mittleren TRF über Southernblotting fließen hier keine subtelomerischen Sequenzen mit in die Bestimmung ein. Die Detektion der markierten Telomersequenzen kann in einem Durchflusszytometer (Flow-FISH) (Abschnitt 3.2.2.2) oder unter einem Fluoreszenzmikroskop (Q-FISH) stattfinden (Abschnitt 3.2.2.3).

3.2.2.1 Analyse der Telomerlänge mit der „Southernblot“- Methode

Für die TRF-Analyse wurden 1×10^6 Zellen von Zellkulturen oder Geweben verwendet und mit Hilfe des DNA-Isolationskits (Quiagen) wurde daraus genomische DNA isoliert. Die Konzentration der DNA wurde durch die photometrischen Bestimmung des Quotienten von 260/280 nm ermittelt. Für die Berechnung der DNA-Konzentration gilt $1OD_{260nm} = 50 \mu\text{g/ml}$. Danach wurden 10 µg DNA mit 5 u RSA I und 5 u Hinf I für 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Die gespaltene DNA wurde dann auf ein 0,7 % Agarosegel aufgetragen und bei 25 V 14 h lang

elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA im Agarosegel mit Southern-Lösung I für 45 min denaturiert und in Southern-Lösung II für 60 min neutralisiert. Danach erfolgte über 1,5 h ein Vakuumtransfer der DNA auf eine Nylonmembran in 2 x SSC bei weniger als 0,5 Hg. Abschließend wurde die Blotmembran kurz mit Wasser gewaschen und die DNA mit UV-Licht im Stratalinker mit 1200 J an der Membran vernetzt.

Die TRF-Sonde für die Hybridisierung wurde mit dem DIG Oligonukleotide 3'-End Labeling Kit (Roche Diagnostics) mit Digoxigenin (DIG) markiert. In einem Standard Assay werden 100 pmol bzw. 1 µg eines 30mer Oligos eingesetzt. Die verwendete TRF-Sonde war ein 24mer mit der vierfachen Telomerasequenz TTAGG, welches eine Konzentration von 11,8 pmol/µl besaß. Das zur Kontrolle der Markierung verwendete Oligonukleotid hatte eine Konzentration von 20 pmol/µl.

DIG-Markierungsansatz:	4 µl 5 x Reaction Puffer
	4 µl CoCl ₂ -lösung
	1 µl DIG-ddUTP
	1 µl TdT (50 u)
	10 µl TRF-Sonde
	bzw. 5 µl Kontroll-ON + 5 µl Wasser
	= 20 µl

Die Reaktion wurde mindestens 30 min lang bei 37°C durchgeführt, anschließend auf Eis mit 2 µl 0,2 M EDTA beendet und die markierten Oligonukleotide bei -20°C eingefroren.

Zur Einschätzung der Konzentration des markierten Oligonukleotides und Kontrolle der Markierung wurde eine Verdünnungsreihe des DIG-markierten Oligonukleotid aus dem Kit, dem Kontroll-Oligonukleotid aus der Reaktion und dem TRF-Oligonukleotid hergestellt. Ausgehend von der Konzentration der Oligonukleotide von 2,5 pmol/µl wurden Verdünnungen von 50 fmol/µl, 10 fmol/µl, 2 fmol/µl, 0,4 fmol/µl und 0,08 fmol/µl eingestellt. Nach der Detektion konnte im Vergleich mit dem DIG-markierten Oligonukleotid aus dem Kit die Konzentration der Markierung eingeschätzt werden. Bei einer erfolgreichen Markierung waren die Verdünnungen von 50 fmol/µl gut detektierbar, von 10 fmol/µl noch detektierbar und von 2 fmol/µl schwer detektierbar. Die Konzentration der markierten Oligonukleotide entsprach zumeist wie vorher berechnet 2,5 pmol/µl.

Die Hybridisierung erfolgte in der DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung (Roche Diagnostics). Die Reaktion fand im Hybridisierungssofen für mindestens 6 h oder über Nacht statt. Es wurde bei einer Temperatur von 45°C gearbeitet. Die Membran wurde ca. 30 min in aufgewärmter Hybridisierungslösung vorinkubiert und anschließend mit 4 ml pro 100 cm² und 10 pMol/ml markierter Sonde hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal bei Raumtemperatur für 10 min mit 2 x SSC, 0,5 % SDS und zweimal bei 38°C für je

30 min mit 0,1 x SSC, 0,5 % SDS gewaschen. Anschließend wurde die Membran, wenn möglich gleich zur Detektion verwendet oder kurz an der Luft getrocknet und bis zur Detektion staubfrei und feucht gelagert.

Nach der Hybridisierung wurde die Detektion mit dem DIG Wash and Block Puffer Set (Roche Diagnostics) nach Standardvorschriften durchgeführt. Hierbei wird die hybridisierte, Digoxigenin-markierte Sonde mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert und anschließend über das Alkalische-Phosphatase-Konjugat des Antikörpers und einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Nach kurzem Waschen mit einem Maleinsäurepuffer erfolgt die Blockierungsreaktion für 60 min unter Schütteln. Danach wird der 1 : 10 000 verdünnte Antikörper (75 mU/ml) für 30 min auf der Membran inkubiert, zweimal gewaschen und mit dem Detektionspuffer äquilibriert. Für die Chemilumineszenzreaktion wurde CDP-Star (Roche Diagnostics) verwendet. CDP-Star ist ein ultrasensitives, Chlor-substituiertes 1,2-Dioxietan Chemilumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase. Nach enzymatischer Dephosphorylierung des Substrates erfolgt eine Lichtemission in gepufferter Lösung bei 466 nm, welche auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Das Signal bleibt auf Nylonmembranen mehrere Tage erhalten. Für die Reaktion wird die Membran 5 min mit 1 ml 1 : 100 verdünnter CDP-Starlösung auf 100 cm² Membran im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion zwischen zwei Plastikfolien durchzuführen, erwies sich dabei als sehr geeignet. Die Membran wird anschließend kurz aber nicht vollständig auf Whatman 3MM Papier getrocknet, in Folie verpackt und mit einem Röntgenfilm exponiert. Erste Signale sind schon nach 1 min sichtbar. Die übliche Expositionszeit lag bei 5 bis 30 min.

3.2.2.2 Analyse der Telomerlänge mit der Flow-FISH Methode

Die Flow-FISH Methode wurde im Labor von Dr. M. Blasco in Madrid, wie von Rufer *et al.* beschrieben, durchgeführt (Rufer *et al.*, 1998). Für die Methode wurden proliferierende Zellkulturen verwendet, welche sich in der G1-G0 Phase des Zellzyklus befanden. Die Methode kann optimal nur mit Zellen aus Suspensionen oder Zellkulturen durchgeführt werden. Zur Standardisierung der Ergebnisse wurden zwei Leukämie-Zelllinien der Maus (LY-R und LY-S) mit bekannter Telomerlänge von 9 und 40 Kb genutzt (Alexander & Mikulski, 1961; McIlrath *et al.*, 2001) (siehe auch Abbildung 3-1). Für die Analyse wurden 5 x 10⁵ Zellen pro Probe verwendet. Diese wurden zuerst zweimal mit PBS und 0,1 % BSA gewaschen und anschließend in 500 µl der Hybridisierungslösung resuspendiert. Es wurden jeweils eine Probe mit und eine Kontrolle ohne Hybridisierungsprobe parallel behandelt.

Hybridisierungslösung	70 % deionisiertes Formamid 20 mM Tris, ph 7,0 1 % BSA 0,3 µg/ml telomerspezifische PNA-Probe FITC markiert
-----------------------	--

Die Proben wurden 10 min unter Schütteln bei 80°C denaturiert und anschließend im Dunkeln bei Raumtemperatur 2 h inkubiert. Nach der Hybridisierungsreaktion erfolgten drei Waschschriffe, zwischen denen 8 min bei 3000 rpm und 16°C zentrifugiert wurde. Die erste Waschlösung bestand aus 70 % Formamid, 10 mM Tris, ph 7,2; 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20; nachfolgend wurde PBS mit 0,1 % BSA und 0,1 % Tween 20 verwendet. Nach dem dritten Waschgang wurde der Waschlösung 10 µg/ml RNase und 0,1 µg/ml Propidiumiodid zugefügt und zur Anfärbung der Zellkerne bei Raumtemperatur 2-4 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben nach einer Filtration durch einen 30 µm Filter im Durchflußzytometer (FACS) analysiert. Für die Analyse wurde das FACS-Gerät Coulter Flow EPICS XL und die SYSTEM 2 Software (Coulter, Miami, FL) verwendet. Die mittlere Telomerfluoreszenz der Zellen wurde nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz ohne Telomerprobe im Verhältnis zur Telomerfluoreszenz der Zellen LY-R und LY-S mit bekannter Telomerlänge berechnet.

3.2.2.3 Analyse der Telomerlänge mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH)

Die Analyse der Telomere mit der FISH-Methode wurde hier zur Untersuchung der Telomerlängen und der genetischen Stabilität der Chromosomen verwendet. Dafür wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss) mit einer MicroImager MI1400-12 Kamera und dazugehöriger Software (Xillix), sowie die Auswertungssoftware zur Telomerlängenbestimmung TFL-Telo (Martens *et al.*, 1998) verwendet. Dieses stand im Labor von Frau Dr. M. Blasco zur Verfügung.

Voraussetzung für die Messung der Telomerlänge am Chromosom sind fixierte Metaphase-Chromosomen. Zur Gewinnung einer großen Anzahl von mitotischen Zellen wurden proliferierende RENCA-Zellen mit 0,1 µg/ml Colcemid (GIBCO BRL) für 4 h behandelt, anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und für 8 min bei 120 g zentrifugiert. Nach einer hypotonischen Schwellung in 0,06 mM KCl wurden die Zellen 25 min bei 37°C inkubiert und in Methanol-Essigsäure-Verhältnis 3:1 fixiert. Nach dreimaligem Wechsel der Fixierungslösung wurden 2-3 Tropfen der Zellsuspension auf nasse, gereinigte Objektträger getropft und die präparierten Metaphasechromosomen über Nacht getrocknet.

Für die Hybridisierung mit der PNA-Sonde wurden die Objektträger anschließend wieder mit PBS rehydriert und in 4 % Formaldehyd fixiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit 1 mg/ml Pepsin, nochmaliges Waschen und eine Dehydrierung mit der Ethanolreihe. Die Hybridisierung fand in einer Lösung mit 70 % Formamid, 10 mM Tris, ph 7,2, 0,5 % Blocking

Puffer und 0,3 µg/ml der Telomer-PNA Probe, welche Fluoreszenz markiert war, für 2 h bei Raumtemperatur statt. Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger wieder gewaschen dehydriert. Zur besseren Auswertung der Präparate wurden die Chromosomen mit 200 ng/ml DAPI gegengefärbt. Die Färbung ist bei 4°C im Dunkeln über einige Tage haltbar.

Im vorliegenden Fall wurde diese Methode zur Untersuchung der Chromosomen verwendet und keine quantitativen Analysen der Telomerlängen durchgeführt.

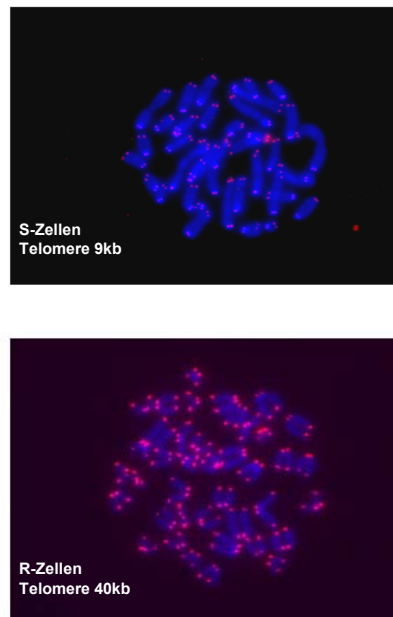


Abbildung 3-1 FISH mit einer PNA-Probe für die Telomersequenz an den Kontrollzellen Ly-S und Ly-R mit einer Telomerlänge von 9 kb und 40 kb.

Am Beispiel der Kontroll-Zelllinien Ly-S und Ly-R mit sehr unterschiedlichen Telomerlängen (9 bzw. 40 kb) (siehe Abbildung 3-1) wird der Zusammenhang der Telomerlänge und der Telomerfluoreszenz deutlich. Eine quantitative Bestimmung der Telomerlängen könnte durch Messungen der Stärke der Fluoreszenz von ca. 100 Metaphasechromosomen im Vergleich zur Fluoreszenz von Kontrollplasmiden, die als künstliche Telomere mit bekannter Länge fungieren, durchgeführt werden. Eine Beschreibung der detaillierten Methode und der quantitativen Analyse der Fluoreszenzen ist in Hande *et al.* zu finden (Hande *et al.*, 1999).

3.2.3 Bestimmung der Expression der Telomerase-RNA hTR und der katalytischen Untereinheit hTERT

3.2.3.1 RNA-Extraktion

Für alle Experimente wurde die RNA mit RNAzol™ B, einer Fertiglösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat bestehend, isoliert. Die Zellen aus der Zellkultur wurden zweimal mit PBS gewaschen und kurz zentrifugiert, Gewebe wurde in 5-10 10 µm starke Schnitte mittels

des Mikrotoms geschnitten und dann jeweils mit 0,5-1 ml RNAzol homogenisiert. Anschließend mit 1/10 Chloroform versetzt, 5 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen, mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 14000 rpm, 4°C, 15 min, wonach der Überstand verworfen wird. Das Pellet wird noch mal mit 75 % Ethanol gewaschen, nach der Zentrifugation für 8 min bei 8000 rpm getrocknet und in 50 µl DEPC-haltigem Wasser gelöst. Die Reinheit und Konzentration der RNA wird durch Messung der Absorption bei den Wellenlängen von 260 und 280 nm, sowie der Berechnung des Quotienten von 260/280 nm bestimmt. Der Quotient für qualitativ gute RNA ohne Verunreinigungen liegt zwischen 1,8 und 2,0. Für die Konzentrationsbestimmung von RNA gilt $1OD_{260nm} = 40 \mu\text{g/ml}$. Anschließend wurde die Qualität der isolierten RNA durch elektrophoretische Auftrennung von 1 µg RNA auf einem Agarosegel überprüft. Als Gütekontrolle sind die 28 S und 18 S rRNA mit etwa 5,1 kb und 1,8 kb zu sehen.

Da die Extraktion der RNA mit dieser Methode mögliche Verunreinigungen mit DNA hinterlässt, wurde für die quantitative Bestimmung der Expression der Telomerase-Untereinheiten am LightCycler die RNA nochmals mit DNase behandelt. Dafür wurden 10 µg RNA mit 10 u DNase für 60 min bei 37°C gespalten und anschließend über eine Phenol-Chloroform Fällung die abgespaltene DNA abgetrennt. Danach erfolgte eine nochmalige Bestimmung der RNA-Konzentration.

3.2.3.2 Expressionsuntersuchung von hTR und hTERT mit dem RT-PCR-ELISA

Zur Untersuchung der Expression der Telomerase-RNA hTR und der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT wurden von der Firma Roche Diagnostics Probekits für eine RT-PCR mit anschließender Detektion der Produkte auf einer ELISA-Basis zur Verfügung gestellt.

In den Kits waren jeweils alle nötigen Reagenzien für die RT-PCR und die ELISA-Detektion vorhanden. Primersequenzen und Produktgrößen wurden von der Firma nicht mitgeteilt. Es wurden Einzelschritt RT-PCRs mit genspezifischer cDNA Umschreibung durchgeführt. Ein Primer besaß jeweils eine Biotinmarkierung. Für die RT-PCRs wurden 100 ng RNA als Ausgangsmaterial verwendet. Die Bedingungen für die RT-PCRs sind in Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2 zusammengefasst. Der Nachweis der hTERT erfolgte mittels einer zweifachen PCR (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-1 PCR-Bedingungen für den hTR RT-PCR ELISA

hTR RT-PCR			
PCR-Ansatz	25 µl Reaction Mix 0,4 µl AMV RT 0,4 µl Taq-Polymerase 5 µl RNA (100 ng) 19,2 µl Wasser		
RT-PCR Bedingungen	RT-Schritt	30 min	50°C
	Inaktivierung	2 min	94°C
PCR 25 Zyklen	Amplifikation	45 s	94°C
	-Denaturierung	45 s	55°C
	-Anlagerung der Primer	45 s	72°C
	-Polymerisation	10 min	72°C
	Verlängerung Lagerung		4°C

Tabelle 3-2 PCR-Bedingungen für den hTERT RT-PCR ELISA

hTERT RT-PCR			
PCR-Ansatz	25 µl Reaction Mix 1 0,4 µl AMV-RT 0,4 µl Taq-Polymerase 5 µl RNA 100 ng 19,2 µl Wasser		
RT-PCR-Bedingungen	RT-Schritt	30 min	50°C
	Inaktivierung	2 min	94°C
1. PCR 35 Zyklen	Amplifikation	30 s	94°C
	-Denaturierung	30 s	64,5°C
	-Anlagerung der Primer	30 s	72°C
	-Polymerisation	7 min	72°C
	Verlängerung Lagerung		4°C
2. PCR 18 Zyklen	48,6 µl Reaktion Mix 2 0,4 µl Taq-Polymerase 1 µl RT-PCR Ansatz		
	RT-Inaktivierung	2 min	94°C
	Amplifikation		
	-Denaturierung	30 s	94°C
	-Anlagerung der Primer	30 s	64,5°C
	-Polymerisation	30 s	72°C
	Verlängerung Lagerung	7 min	72°C 4°C

Die Detektion der markierten PCR Produkte erfolgte über das gleiche System von Hybridisierung mit anschließender ELISA-Reaktion wie der Nachweis der TRAP-Assay Produkte (Abschnitt 3.2.1.2). Zuerst wurden 2,5 µl der PCR-Produkte mit 10 µl einer

Denaturierungsreagenz aus dem Kit gemischt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 110 µl des Hybridisierungspuffers hinzugegeben und je 100 µl des Gemisches in eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte überführt. Diese wurde 2 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Hier erfolgt die Bindung der Biotin-markierten PCR Produkte an die Platte. Anschließend wurde dreimal durch Zugabe von 250 µl Waschpuffer je Vertiefung gespült. Dann erfolgte die Inkubation mit 10 mU/ml Anti-DIG-POD (POD-Peroxidase) Antikörperlösung. Nach 30 min Schütteln bei Raumtemperatur wurde wieder fünfmal gewaschen und dann die Lösung vollständig entfernt. Die Substratreaktion fand mit je 100 µl TMB-Substrat (TMB-Tetramethylbenzidin) 10 min bei Schütteln unter Lichtausschluss statt. Hier kommt es zu einer Hellblaufärbung der Reaktion. Anschließend wurde die Reaktion mit 100 µl Stoppreaktion beendet. Dies ging einher mit einem Farbumschlag nach Gelb. Die Messung der Absorption wurde bei 450 nm Wellenlänge und einer Referenzwellenlänge von 690 nm in einem Photometer durchgeführt.

3.2.4 Das LightCycler PCR Analysesystem

Der LightCycler ist ein völlig neu entwickeltes PCR Analysesystem, das äußerst schnelle Zykluszeiten für die PCR mit einer gleichzeitigen „Real-Time“ Detektion der Reaktionskinetik ermöglicht. Mit dieser Technologie verkürzt sich die Zeit von einer konventionellen RT-PCR mit Reverser Transkription, PCR und Analyse von 5 h auf nur 20-30 min. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Amplifikation und Analyse in ein und demselben Reaktionsgefäß ohne ein zwischenzeitiges Öffnen erfolgen.

Im LightCycler ist ein ultraschnelles PCR Gerät mit einem Fluorimeter kombiniert wurden (Abbildung 3-2). Der Aufheiz- und Abkühlungsprozess wird durch wechselnde Zufuhr von heißer und Umgebungstemperatur-temperierter Luft gesteuert. Durch die geringe Masse der Luft können sehr schnell Temperaturwechsel erzielt werden. Diese Technik wird durch den besonders effizienten Hitzetransport an den, als Reaktionsgefäßen eingesetzten Glaskapillaren, begünstigt. Die Kapillaren ermöglichen gleichzeitig die Verwendung sehr kleiner Reaktionsvolumina von 10-20 µl.

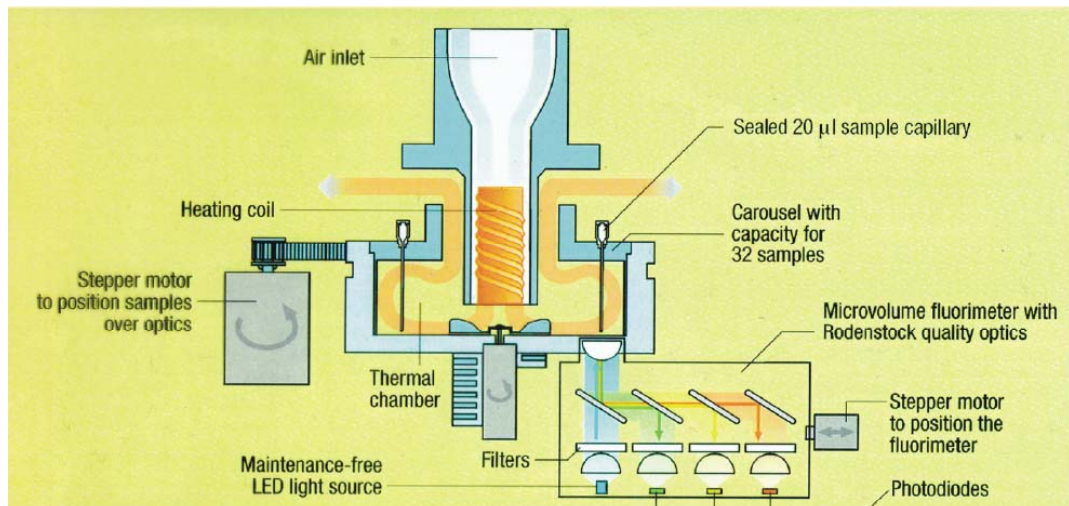


Abbildung 3-2 Technisches Prinzip und Aufbau des LightCyclers

Das Fluorimeter beherbergt die Lichtquelle, eine wartungsfreie LED (Licht-emittierende Diode). Das emittierte Licht wird gefiltert und auf die Spitze der Kapillare fokussiert. Die von der Probe ausgesandte Fluoreszenz wird von der Linse gesammelt, spezifisch gefiltert und an einen Photohybrid-Detektor weitergeleitet. Die optische Einheit ermöglicht die Detektion von drei Farben, die für die unterschiedliche Aufgabenstellungen notwendig sind.

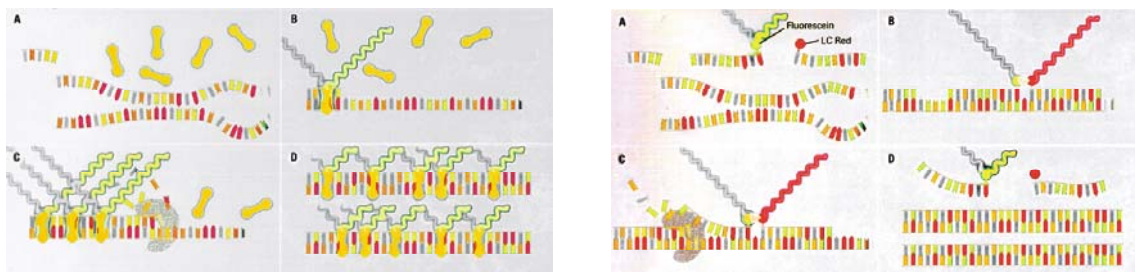


Abbildung 3-3 Quantitatives Analyseprinzip des LightCyclers: Bindung von SYBR Green an die DNA (links) und Bindung der markierten Hybridisierungsproben (rechts). Die Lichtemission beim Einsatz von SYBR Green erfolgt beim Entstehen von doppelsträngiger DNA, währenddessen bei Verwendung von Fluoreszenzproben die Emission in der Anlagerungsphase der PCR vorstatten geht.

In der vorliegenden Arbeit wurde der LightCycler (LC) mit zwei verschiedenen Fluoreszenztechniken eingesetzt (Abbildung 3-3). Für die quantitativen Untersuchungen der dominant-negativen Mutante von mTERT in RENCA-Klonen wurde eine Detektion der Produkte mit dem SybrGreen® I Farbstoff und eine anschließende Schmelzpunktanalyse verwendet (siehe Abschnitt 3.2.4.2). Der SybrGreen® I Farbstoff bindet an die während der PCR entstehende doppelsträngige DNA, wobei sich während der PCR die abgestrahlte Fluoreszenz stark erhöht. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur DNA-Konzentration und wird einmal pro Zyklus in der Amplifikationsphase gemessen. Eine zusätzliche Spezifität lässt

sich nach der PCR durch eine Schmelzpunktanalyse erzielen, die das PCR-Produkt verifiziert. Der charakteristische Schmelzpunkt eines PCR-Produktes ermöglicht die eindeutige Identifizierung des Produktes. Primerdimere oder andere Artefakte schmelzen dagegen bei veränderter Temperatur meist in einem größerem Temperaturbereich auf.

In den Untersuchungen zur Quantifizierung der hTR und hTERT kamen Hybridisierungsproben zum Einsatz, die auf der Basis des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET) funktionieren. Das „hybridization probe“ Format ermöglicht gegenüber der SYBR Green® Anwendung eine spezifischere Detektion des Amplifikationsproduktes. Hier wird eine spezifische Reaktion von zwei Hybridisierungssonden an einem Amplifikationsprodukt detektiert (Abbildung 3-3 rechts). Die Hybridisierungssonden bestehen aus zwei Oligonukleotiden, die innerhalb des amplifizierten Fragmentes binden. Das Ende der 3' Probe ist mit einem Donor-Fluorophor, hier Fluoreszin, markiert, wohingegen das 5'-Ende der benachbarten Probe mit dem Akzeptor-Fluorophor, in diesem Falle LightCycler-Red 640, verbunden ist (siehe Abbildung 3-3 A). Nur während der Hybridisierungsphase am PCR-Produkt kommen die zwei Proben in eine enge Nachbarschaft, ca. 2-4 Nukleotide entfernt, in der es zu einem Energietransfer zwischen den Fluorophoren kommen kann (Abbildung 3-3 B). In der Polymerisationsphase der PCR lösen sich die markierten Hybridisierungsproben wieder von der Sequenz, so dass in diesem Schritt kein FRET und keine Fluoreszenzmessung erfolgt (Abbildung 3-3 C,D). Während des FRETs wird die Donorfluorophore Fluoreszin durch die Lichtquelle des LC angeregt und Licht emittiert, das durch die Akzeptorfluorophore, LC-Red 640, absorbiert wird. Die emittierte Fluoreszenz des LC-Red 640 wird dann vom LC-Instrument gemessen. Die Höhe des FRET-Signales ist proportional zu der Menge des spezifischen DNA-Produktes, das für eine Hybridisierung zur Verfügung steht, d.h. das Signal nimmt bei erfolgreicher PCR mit jedem Zyklus zu.

3.2.4.1 Quantitative RT-PCR von hTR und hTERT mit dem LightCycler

Die quantitativen Untersuchungen der Expression von hTERT mRNA und hTR RNA erfolgten mit von Roche Diagnostics evaluierten Kits für den LightCycler - LightCycler Telo TAGGG hTERT Quantification Kit und LightCycler Telo TAGGG hTR Quantification Kit. Hierfür wird jeweils eine Einzschritt RT-PCR in den Glaskapillaren des LC-Systems durchgeführt. Die spezifischen PCR-Produkte werden während der PCR mit einem für das Produkt spezifischen Paar von Hybridisierungsproben detektiert. In einer separaten RT-PCR wird die PBGD mRNA - Phosphobillinogen Deaminase - detektiert, welche als Kontrolle für die RT-PCR und als Referenz für die Quantifizierung genutzt wird. Die LightCycler Kits stellen alle nötigen Reagenzien, Primer und Hybridisierungsproben als Mastermixe, sowie RNA-Standards für die

Standardkurve zur Verfügung. Eine Kontroll-RNA zur Überprüfung der Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit des Systems wird ebenfalls bereitgestellt.

Die Sensitivität der Kits ist mit der Detektion von bis zu 100 Kopien hTERT mRNA oder hTR RNA beschrieben. Die Standardkurve für die Bestimmung der hTERT mRNA ausgehend von in-vitro-transkribierter RNA ermöglicht eine lineare Messung von 10^2 bis 10^6 Kopien hTERT RNA. Für hTR RNA liegt der Bereich zwischen 10^3 und 10^7 Kopien in-vitro-transkribierter hTR RNA. Es wird beschrieben, dass die Primer für die verwendeten Kits spezifisch für die nachzuweisenden RNAs ausgewählt und evaluiert worden sind. Die Produktlänge des hTERT PCR-Fragmentes beträgt 198 bp. Die beschriebenen Splicevarianten für hTERT sind dabei berücksichtigt worden (Kilian *et al.*, 1997; Ulaner *et al.*, 1998). Die Primer für hTERT und PBGD sind unter Beachtung der Exon-Intron-Grenzen ausgewählt worden, um eine gleichzeitige Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden. Das für hTR kodierende Gen ist intronfrei, deshalb können die Primer für hTR RNA nicht die RNA spezifisch detektieren. Zur Absicherung einer DNA-kontaminationsfreien PCR von hTR wurden jeweils Kontrollen ohne die reverse Transkription durchgeführt und die erhaltene Kopienzahl von dem RT-PCR Ergebnis abgerechnet. Die jeweiligen Primer der RT-PCRs sind so entwickelt worden, dass einer von ihnen für die genspezifische reverse Transkription genutzt wird.

Für die Expressionsuntersuchungen der hTERT mRNA in Nierentumorgewebe und Normalgewebe wurden jeweils 100 ng Gesamt-RNA im LightCycler Telo TAGGG hTERT Quantification Kit eingesetzt. Die hTERT mRNA und die PBGD mRNA Expression wurde für jede Probe parallel bestimmt. In einem PCR-Lauf auf dem LightCycler können 32 Proben gemessen werden, dieser beinhaltet die fünf hTERT RNA Standards zur Generierung der Standardkurve, eine PCR der Kontroll-RNA für hTERT und PBGD, sowie Wasserkontrollen für hTERT und PBGD.

Ein PCR-Ansatz bestand aus:

- 2 µl hTERT Reaktionsmix (mit Puffer, dNTPs und Magnesiumchlorid)
 - 2 µl hTERT oder PBGD Detektionsmix (mit spezifischen Primern und Hybridisierungsproben)
 - 0,1 µl Reverse Transkriptase
 - 13,9 µl Wasser
- sowie 2 µl RNA oder Standard-RNA oder Wasser.

LightCycler RT-PCR Konditionen:

Reverse Transkription	10 min, 60°C, Transitionsrate 20°C/s
Denaturierung	30 s, 95°C, Transitionsrate 20°C/s
PCR-Amplifikation	95°C, Inkubationszeit 0 s, Transitionsrate 20°C/s
	60°C, Inkubationszeit 10 s, Transitionsrate 20°C/s
	72°C, Inkubationszeit 10 s, Transitionsrate 2°C/s
Kühlung des Rotors	40°C, 60 s, Transitionsrate 20°C/s

Die hTERT PCR Amplifikation fand mit 40 Zyklen statt.

Die Auswertung der PCR-Läufe erfolgte standardisiert mit der Analysesoftware des LightCycler-Systems. In der „Second Derivative Maximum Methode“ wird automatisch für jede Probe der „Crossing Point“ kalkuliert, damit keine benutzerabhängigen Einflüsse der Analyse auftreten können. Diese Methode berechnet die Kopienanzahl pro Probe aufgrund der Standardkurve über den „Crossing Point“. Der „Crossing Point“ stellt den Punkt des ersten Zyklus mit messbarer Fluoreszenz dar.

Für die quantitative Analyse wurde das Verhältnis der Kopienanzahl von hTERT mRNA pro Probe und der Kopienanzahl von PBGD mRNA berechnet. Dieser normalisierte Wert wurde zur besseren Handhabbarkeit mit dem Faktor 1000 multipliziert. Das Ergebnis dieser Formel wird als Expressionseinheiten [E.E] angegeben. Die Formel lautet dann:

$$\text{hTERT}_{\text{normalized}} \text{ in [E.E]} = (\text{hTERT Kopien} / \text{PBGD Kopien}) \times 1000$$

Die Bestimmung der hTR RNA Expression wurde mit dem LightCycler Telo TAGGG hTR Quantification Kit durchgeführt. Für jede Probenanalyse waren hier drei PCR-Reaktionen nötig, jeweils eine für die hTR RNA mit reverser Transkription und eine ohne reverse Transkription als Kontrolle, sowie eine Reaktion zum Nachweis des Kontrollgens PBGD. Auch hier wurden 100 ng RNA jeder Probe, sowie Wasser als negative Kontrolle und die Kontroll-RNA eingesetzt. Die Standardkurve wurde in diesem Fall mit in-vitro-transkribierter hTR RNA in Konzentrationen von 10^3 bis 10^7 Kopien generiert.

Der PCR-Ansatz bestand aus:

- 2 µl hTR Reaktionsmix (mit Puffer, dNTPs und Magnesiumchlorid)
 - 2 µl hTR oder PBGD Detektionsmix (mit spezifischen Primern und Hybridisierungsproben)
 - 0,1 µl Reverse Transkriptase (nicht für die Proben ohne RT)
 - 13,9 µl Wasser
- sowie 2 µl RNA, Standard-RNA oder Wasser

LightCycler hTR-RT-PCR Konditionen:

- | | |
|-----------------------|--|
| Reverse Transkription | 10 min, 60°C, Transitionsrate 20°C/s |
| Denaturierung | 30 s, 95°C, Transitionsrate 20°C/s |
| PCR- Amplifikation | 95°C, Inkubationszeit 0 s, Transitionsrate 20°C/s |
| | 60°C, Inkubationszeit 10 s, Transitionsrate 20°C/s |
| | 72°C, Inkubationszeit 10 s, Transitionsrate 20°C/s |
| Kühlung des Rotors | 40°C, 60 s, Transitionsrate 20°C/s |

Die hTR Amplifikation fand mit 45 Zyklen statt.

Die Auswertung der hTR RNA Expressionsuntersuchungen erfolgte mit demselben Verfahren, wie vorher für die hTERT Untersuchungen beschrieben. Jedoch war es in diesem Fall nötig, die Kopienanzahl der Reaktion ohne Reverse Transkription von der Kopienanzahl der

Reaktion mit Reverser Transkription abzuziehen und diese Differenz mit der Kopienanzahl von PBGD ins Verhältnis zu setzen. Aufgrund der viel höheren Expressionsrate war es nicht nötig einen Faktor in die Berechnung einzubringen. Das Ergebnis dieser Formel wird als Expressionseinheiten [E.E.] angegeben. Die Formel lautet:

$$\text{hTR}_{\text{normalized}} \text{ in [E.E.]} = \frac{\text{hTR Kopien mit RT} - \text{hTR Kopien ohne RT}}{\text{PBGD Kopien pro Probe}}$$

3.2.4.2 Quantitative Bestimmung der dominant-negativen Mutante von mTERT per LightCycler PCR

Der quantitative Nachweis des dominant-negativen Transkriptes der mTERT Mutante und des mTERT Wildtyp-Transkriptes in den transfizierten RENCA-Klonen erfolgte ebenfalls mit einer RT-PCR auf dem LightCycler. Hierfür wurde der LightCycler–RNA Amplification Kit SYBR Green I von Roche Diagnostics mit anschließender Bestimmung der Schmelzpunkte der PCR Produkte verwendet. Dieser Kit ist für eine Einschnitt RT-PCR in Glaskapillaren des LC-Systems adaptiert und kann unter Benutzung beliebiger Primer angewendet werden. Eine Produktgröße nicht größer als 750 bp, optimal von ca. 500 bp, wird empfohlen. Für eine gute Reproduzierbarkeit liegen im Kit alle benötigten Reagenzien, außer Template-RNA, Primer und MgCl₂ in einem Mastermix vor. Die Einstellung der MgCl₂-Konzentration kann target-spezifisch zwischen 3 und 7 mM pro Ansatz vorgenommen werden. Die empfohlene Primerkonzentration für den Kit liegen zwischen 0,3 und 1 µM. Für die Untersuchungen wurden Konzentrationen von 6 mM MgCl₂, 0,5 µM Primer und 200 ng RNA verwendet.

Ein Standard RT-PCR-Ansatz besteht aus:

4,0 µl LightCycler-RT-PCR Reaction Mix SYBR Green I
 2,4 µl 25mM MgCl₂
 0,4 µl RT-PCR Enzym Mix
 10,2 µl Wasser
 2,0 µl Primer Mix
 sowie 1µl RNA oder Standard-RNA oder Wasser

PCR-Bedingungen:

Reverse Transkription	15min, 55°C, Transitionsrate 20°C/s
Denaturierung	30 s, 95°C, Transitionsrate 20°C/s
PCR-Amplifikation	95°C, Inkubationszeit 0 s, Transitionsrate 20°C/s 55-65°C, Inkubationszeit 10 s, Transitionsrate 0°C/s 72°C, Inkubationszeit 11 s, Transitionsrate 2°C/s
Schmelzkurve	97°C, Inkubationszeit 0 s, Transitionsrate 20°C/s 65-75°C, Inkubationszeit 10 s, Transitionsrate 0°C/s 97°C, Inkubationszeit 0 s, Transitionsrate 0,1°C/s
Kühlung des Rotors	60 s, 40°C, Transitionsrate 20°C/s

Für die Amplifikation wurden 40 bis 50 Zyklen durchgeführt.

Die Analyse erfolgte mit der LightCycler Analysesoftware. Hierfür können zwei verschiedene Auswertungsmodi, das Programm für die Quantifizierung oder die Schmelzkurvenauswertung, verwendet werden. Für die Untersuchung der dominant-negativen Konstrukte in den transduzierten RENCA-Zellen wurde die Schmelzkurve zur semi-quantitativen Bestimmung der Produkte benutzt, da keine Standards zur Generierung einer Standardkurve zur Verfügung standen.

Die der PCR nachgeschaltete Schmelzkurve bestimmt die Schmelztemperatur der entstandenen Produkte. Die doppelsträngigen Produkte mit spezifischer Größe und Zusammensetzung der Nukleotide besitzen eine spezifische Temperatur, bei der die beiden DNA-Stränge beginnen zu hybridisieren. Bei höheren Temperaturen denaturieren sie wieder. Die größte Fluoreszenz wird bei der spezifischen Schmelztemperatur des Produktes gemessen, da hier die höchste Anzahl an SYBRGreen-Molekülen mit dem Doppelstrang interkalieren. Für die Schmelzkurve wird nach der Denaturierung die Temperatur im PCR-Gerät ab 10°C über der Annealingtemperatur in einer geringen Transitionsrate von 0,1°C/s gesteigert und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Zur Identifizierung der Größe wurden die Produkte anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Mit Hilfe der Produktgröße kann den Produkten dann die Schmelzkurve zugeordnet werden. Diese Schmelzkurven erlauben somit die Diskriminierung von Primerdimeren, Kontaminationen und spezifischen Produkten. Die Fluoreszenzdifferenz gegen die Temperatur aufgetragen, ergibt eine Glockenkurve. Für eine semi-quantitative Bestimmung der Produkte kann die Fläche unter der Schmelzkurve genutzt werden. Viel doppelsträngiges Produkt bedeutet also eine hohe Fluoreszenz des SYBR Green-Farbstoffes, welches einen hohen Flächeninhalt unter der Kurve der Fluoreszenz in der Auswertung nach sich zieht. Die Anwendung der SYBR Green Detektion auf dem LightCycler mit anschließender semi-quantitativer Auswertung benötigt nicht mehr als eine Stunde Zeit.

3.2.5 Klonierungen und Konstruktion der Vektoren

3.2.5.1 Antisense-mTR Konstrukte

Die RNA-Komponente der murinen Telomerase ist auf einem kurzen Intron-freien Abschnitt des Mausgenoms kodiert (Blasco *et al.*, 1995) und wurde mittels Standard-PCR kloniert. Anhand der veröffentlichten Sequenz (EMBL Accesion Nummer: U33831) wurden zwei Primer (mTR-U24 und mTR-L413) ausgewählt, welche die Amplifikation eines 412 bp langen DNA Fragments der mTR aus genomischer RENCA-DNA gestattete (siehe unter Material 3.1.3). Die PCR-Fragmente wurden mittels überhängender TA-Enden direkt in pCRTM3 (Invitrogen) kloniert (Abbildung 3-4). Der pCRTM3-Vektor ist ein eukaryontischer Expressionsvektor, der gleichzeitig eine G-418 (GENETICINTM)-Resistenz überträgt. Es wurden sowohl sense als

auch antisense Konstrukte - pCRTM3.mTRas mit antisense-mTR und pCRTM3.mTRs mit sense-mTR - erhalten. Die pCRTM3-basierenden Konstrukte sind in der Lage, die mTR konstitutiv mittels des CMV-Promoters zu exprimieren. Die Identität und die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung ermittelt.

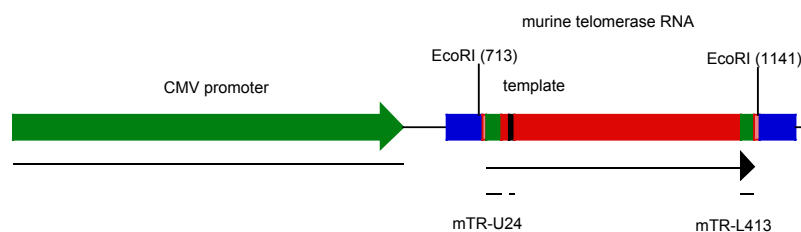


Abbildung 3-4 Konstrukt der murinen Telomerase-RNA im Vektor pCR3

3.2.5.2 Dominant-negative Mutation der mTERT

Die vollständige cDNA-Sequenz der Telomerase Reversen Transkriptase der Maus (mTERT) und die Mutation der mTERT-Sequenz wurde im Labor von Frau Maria Blasco in Madrid generiert. Sie entspricht der in der Datenbank abgelegten Sequenz mit EMBL Accession Nummer AF051911. Die mTERT-Sequenz wurde in einem pBlueskript SK⁻ Vektor kloniert und zur Herstellung der Mutante genutzt. Die Mutation wurde in das katalytische Zentrum der mTERT eingefügt. Dafür wurden zwei Aminosäuren, Aspartat⁸⁶¹ (D) und Aspartat⁸⁶² (D), in zwei Alanine (A) verändert (siehe Abbildung 3-5).

Sequenz mTERT	
bp 2572 bis 2596	5' CGT TTT GTT GAT GAC TTT CTG GTT GG 3'
Normale AS-Sequenz	R F V D ⁸⁶¹ D ⁸⁶² F L L
Mutant-Oligo mTERT	5' CGT TTT GTT GCT GCC TTT CTG GTT GG 3'
Mutierte AS-Sequenz	R F V A A F L L

Abbildung 3-5 Mutation der mTERT-Sequenz zum Austausch der zwei Aspartat- (D) in zwei Alaninmoleküle (A)

Es wurde zuerst das mutierte Oligonukleotid (Abbildung 3-5) an das einzelsträngige DNA-Template Plasmid gebunden, dann mit der T7 DNA Polymerase und der T4 DNA Ligase der Doppelstrang am mutierten Oligonukleotid synthetisiert. Mit Hilfe der T5 Exonuklease wird anschließend das DNA-Template-Plasmid vollständig verdaut, so dass jetzt nur noch der mutierte Strang vorliegt. Der nicht-mutierte Strang wird zum Schluss mit der DNA-Polymerase wieder vollständig hergestellt.

Anschließend wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym Eco RI die mutierte mTERT cDNA aus dem pBlueskript SK⁻ Vektor in den retroviralen Vektor pBABE mit einer Puromycinresistenz umkloniert (Abbildung 3-6). Das erhaltene Plasmid wurde mit pBABE-DN, DN steht für

dominant-negativ, bezeichnet. Auf den Wirkmechanismus der dominant-negativen Mutante wird im Abschnitt Ergebnisse 4.2.2 eingegangen.

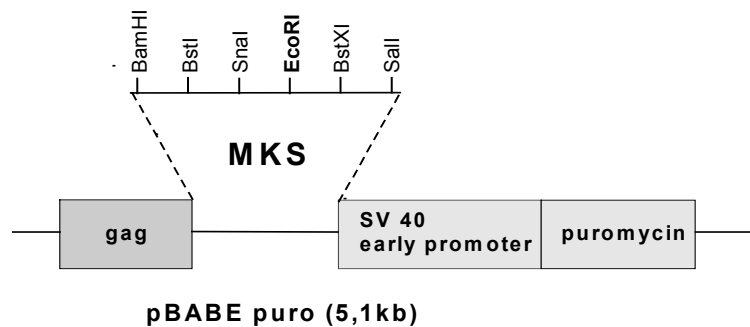


Abbildung 3-6 Schema des Klonierungsortes von pBABE puro aus (Morgenstern & Land, 1990)

Der pBABE puro Vektor ist ein auf dem Mo-MuLV (Moloney murine leukemia virus) basierender, hochtitriger, retroviraler Vektor für den Gentransfer in Säugerzellen (Morgenstern & Land, 1990). Der Vektor ist zusammen mit der Phönix E Verpackungszelle konstruiert worden, um das Risiko, über eine homologe Rekombination den Wildtyp Mo-MuLV zu erhalten, zu minimieren.

3.2.6 Ligation, Transformation der Bakterien und Präparationen der Plasmide

Veränderten Gensequenzen und Vektoren werden mit Hilfe des Enzyms T4 Ligase zu ringförmigen Molekülen verbunden. Das funktioniert optimal, wenn beide Partner gleiche Restriktionsschnittstellen oder, wie bei TA-Klonierungen, überhängende einzelsträngige Adeninnukleotide aufweisen. Die Ligation findet mit 1 u T4 Ligase und 4 µl 5 x Ligationspuffer in 20 µl Volumen über Nacht bei 14°C statt. Zur Kontrolle der Ligation wurden in der Regel 5 µl des Ligationsansatzes vor und nach der Ligation auf ein Agarosegel aufgetragen. Aus zwei Produkten sollte ein ringförmiges Plasmid entstehen.

Die Ligationsprodukte wurden zu deren Vervielfältigung in Bakterien transformiert. Aus den Bakterienkulturen konnten die Plasmide anschließend in gewünschter Menge (Mini- oder Maxipräparationen) isoliert werden. Zur Transformation wurden kommerziell erhältliche DH5α- E.coli Bakterienzellen verwendet. Pro Transformation wurden 50 µl Zellen und 1-10 ng Plasmid-DNA, d.h. ca. 2 µl des Ligationsansatzes, verwendet. Nach der Transformation wurden die Bakterien auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Bakterienkolonien wurden dann zu einzelnen 2 ml Minikulturen propagiert. Maxipräparationen der Plasmide erfolgten in 500 ml LB-Medium und wurden mit 0,5 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Die Mini-Plasmidpräparation wurde dem Protokoll der Firma Qiagen mit folgenden Lösungen angeglichen:

Lösung I:	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCL ph 8,0 10 mM EDTA
Lösung II:	0,2 N NaOH 1 %SDS
Lösung III:	3 M Kaliumacetat, ph 5,5

Nach dem Abzentrifugieren der Kulturen wurden die Pellets in 200 µl der Lösung I resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Zugabe von 400 µl der Lösung II in ca. 5 min bei Raumtemperatur. Danach werden zum Neutralisieren 300 µl der Lösung III hinzugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 14 000 rpm wird die obere flüssige Phase mit 750 µl Isopropanol auf Eis gefällt. Nach weiteren 15 min Zentrifugation wurde nochmals mit 1 ml 85 %igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Für größere Mengen Plasmid wurden Maxipräparationen durchgeführt, wofür entsprechend höhere Volumina der Lösungen aus der Minipräparation verwendet wurden.

3.2.7 Transfektion der Zelllinien

Zum Einbringen von fremdem genetischen Material in Säugerzellen sind diverse Methoden etabliert, wie Kalzium-Phosphat-Methode, DEAE-Dextran Methode, Elektroporation, liposomale oder retrovirale Transfektion. Die Wahl der Methode ist abhängig von der Robustheit der zu transfizierenden Zellen und der gewünschten Effizienz und Stabilität der genetischen Transformation. Die von uns verwendete retrovirale Transfektion darf nur in einem dafür zugelassenen Labor der gentechnischen Sicherheitsstufe S2 durchgeführt werden, welche im Labor von Dr. M. Blasco in Madrid zur Verfügung stand.

3.2.7.1 Elektroporation und Lipid-vermittelte Transfektion

Zellen für die Transfektion sollten proliferations-aktiv sein, um eine hohe Aufnahmeeffizienz der DNA zu erreichen. Ruhende Zellen dagegen sind schlecht transformierbar.

Das Prinzip der Transfektion über die Elektroporation beruht auf der Übertragung der DNA in die Zelle mittels Öffnung der Poren durch einen Stromstoß. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und pro Transfektion wurden 5×10^6 Zellen und 10 µg DNA verwendet. Die gereinigte DNA wurde in die 0,4 cm dicken Küvetten gegeben und die gut resuspendierten Zellen darüber pipettiert. Zur Elektroporation der RENCA-Zellen wurden folgende Parameter verwendet: 200 V und 950 µF; die Transfektion benötigte eine Zeit von 30-40 ms. Nach der Transfektion wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in Petrischalen ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die abgestorbenen Zellen gewaschen und das Selektionsmedium hinzugegeben. Zur Selektion der transfizierten RENCA-Zellen wurde eine

Konzentration von 1 mg/ml Geneticin (G418) verwendet. Die Zeit bis zum Auftreten stabil transformierter Zellklone betrug ca. 3 Wochen, wobei aller 2-3 Tage das Selektionsmedium gewechselt wurde.

Das Prinzip der liposomalen Transfektion beruht auf der Bildung von Liposomen, welche die Nukleinsäuren einschließen. Die polykationischen und neutralen Lipide bilden mit den Nukleinsäuren positiv geladene Komplexe und können diese somit effizient durch die Zellmembran transportieren. Die verwendeten Tfx-Reagenzien (Tfx-10, -20 und -50) der Firma Promega bestehen aus unterschiedlichen Mischungen des kationischen Lipidmoleküls [N,N,N',N'-tetramethyl-N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2,3-di(oleyloxy)-1,4-butandiammoniumiodid] und L-dioleyl-Phosphatidylethanolamin (DOPE). Die Reagenzien beinhalten dieselbe Konzentration des kationischen Lipids, aber unterschiedliche Verhältnisse des Fusionslipids DOPE. Die Reagenzien und die Bedingungen für eine optimale Transfektionsrate sind von dem jeweiligen Zelltyp abhängig. Um die größtmögliche Transfektionseffizienz zu erreichen, müssen zuerst Zelldichte, DNA/Liposomenkomplexbildung und Transfektionszeit optimiert werden. Für die liposomale Transfektion der RENCA-Zellen wurde ein Verhältnis von Tfx50-Reagenz zu DNA von 3:1 ermittelt. Für die liposomale Transfektion wurden die Platten mit ca. 70 %iger Konfluenz vorbereitet. 4,5 µl Tfx50-Reagenz wurden mit 5 µg DNA und 2 ml serumfreien Medium gemischt und zur Komplexbildung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Medium von den Zellen entfernt war, wurde die Mischung auf die Zellen verteilt und für ca. 1 h im 37°C Inkubator belassen. Danach wurde vollständiges Medium hinzugegeben und die Zellen für 48 h weiter inkubiert. Nach zwei Tagen wurde das Medium gewechselt und die Antibiotikaselektion analog zur Elektroporation begonnen.

Diese beiden Methoden wurden für die Transfektion der RENCA-Zellen mit den pCRTM3.mTRas und pCRTM3.mTRs Konstrukten angewendet. Die nach der Transfektion isolierten, stabilen Zellklone wurden mit as-mTR für antisense-mTR und mit s-mTR sense-mTR bezeichnet.

3.2.7.2 Retrovirale Transduktion

Retroviren sind RNA-haltige Viren, die nach Befall einer Wirtszelle durch eine Reverse Transkription ihre RNA in DNA umschreiben und diese dann in das Wirtsgenom integrieren. Für die retrovirale Vektoren wurden diese Eigenschaften genutzt und solche Vektoren konstruiert, die es ermöglichen nichtvirale Gene in mitotische Zellen einzubringen. Die retrovirale Übertragung von Genen wird verwendet, um eine hohe Effizienz der Genübertragung zu erreichen. Nach dem Transduktionsprozess in die Wirtszelle wird eine Kopie des viralen Vektors, einschließlich der zusätzlich zu übertragenden Sequenzen, stabil in das Wirtsgenom eingebaut. Um infektiöse rekombinante Viruspartikel zu erzeugen, wurden

die viralen Proteine *gag*, *pol* und *env* von der Verpackungszelllinie Phönix zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden ca. 70 % konfluente Phönixzellen mit dem Vektor entsprechend dem Protokoll der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Pro Petrischale wurden jeweils 5 µg DNA verwendet, die anschließend über Nacht bei 37°C mit den Zellen zur Infektion inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und mit 1 µM Dexamethason und 1 mM Natriumbutyrat zur Erhöhung der Transkriptionsrate des Virus versetzt. Die Platten wurden zur Virusstabilisierung für 48 h bei 32°C inkubiert. Nach zwei Tagen enthält der Überstand einer Platte genügend Viruspartikel zur Transduktion von Säugerzellen. Der virushaltige Überstand wurde abgenommen und zur Abtrennung der Verpackungszellen durch einen 0,45 µm starken Filter gegeben.

Die Transduktion der RENCA-Zellen mit den rekombinanten Retroviren erfolgte in mehreren Petrischalen mit 50 %iger Konfluenz. Die viralen Partikel wurden 1:1 mit Medium verdünnt und auf zwei Petrischalen mit RENCA-Zellen gegeben. Eine Zugabe von 4 µg/ml Polybren im Medium unterstützt die Bindung der Retroviren an die Zellmembran. Zur Erhöhung der Transduktionsrate wurden die Petrischalen danach für 1 h bei 1500 rpm zentrifugiert. Zwei Tage nach der Virustransduktion wurde das Medium gewechselt und die Antibiotikaselektion mit 0,5 µg/ml Puromycin begonnen. Die Selektion dauerte ca. 10 Tage, jeweils nach 48 h wurde das Medium mit Antibiotika gewechselt. Die mit einem pBABE-lacZ Kontrollvektor transduzierten Platten wurden nach zwei Tagen mit X-Gal Färbelösung analysiert und somit die Effizienz der Transfektion überprüft.

3.2.8 Kultivierung stabil transfizierter RENCA-Klone

Stabil transfizierte Zellen wurden weiter unter ständiger Antibiotikaselektion kultiviert. Die Bestimmung der Populationsverdopplung während der Untersuchungen zur Hemmung der Telomerase erfolgte nach der Formel $PD = \log(n_f/n_0) / \log_2$, wobei n_0 für die Anzahl der Zellen am Beginn und n_f für die Anzahl der Zellen zum Ende der Passage stehen.

3.2.9 Proliferationsmessungen

Die Proliferation der veränderten Zellen wurde mittels des Thymidineinbau, sowie dessen nichtradioaktiver Variante, dem Zellproliferations-ELISAs der Firma Roche Diagnostics, bestimmt. Für die Messungen wurden dreimal je 1000 Zellen in eine 96-Loch-Platte eingesät. Nach 20 h wurde den sich vermehrenden Zellen ^3H -Thymidin oder BrdU (5'Bromo-2'desoxyuridin) hinzugegeben und diese für 20 h inkubiert. Proliferierende Zellen bauen das markierte Thymidin oder das BrdU-Pyrimidinanalog ein. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen an die 96-Lochplatte fixiert, die DNA denaturiert und der Einbau über Szintillation oder eine Immunkomplexfärbung gemessen.

3.2.10 In-vivo Versuche

Die in-vivo Versuche zur Tumorinduktion mit RENCA-Zellen sind im Labor von Frau M. Blasco am Institut für Immunologie und Onkologie in Madrid durchgeführt wurden. Hierfür wurden 10 immunodefiziente BALB/c *nu/nu* Mäuse (Harlan, Barcelona, Spain) eingesetzt. Für die Experimente wurden 10^5 -Zellen von 5 dominant-negativ transduzierten mTERT Zellklonen und 5 pBABE Kontrollklone ohne Insert, aus den ersten Passagen nach der Isolation der stabilen Klone, verwendet und subkutan an jeweils zwei Stellen in die Oberschenkel der Mäuse appliziert. Ab dem 21. Tag konnte das Entstehen eines Tumors beobachtet werden. Das Tumorstadium wurde vom 25. Tag bis zum 42. Tag verfolgt. Ungefähr alle 48 h wurde die Tumorgöße mit einem Messschieber gemessen.

3.2.11 Etablierung von Zelllinien aus den Tumoren, der in-vivo Versuche

Am 42. Tag nach der Inokulation mit den veränderten RENCA-Zellen wurden die noch lebenden Tiere getötet und die Tumoren entnommen. Von drei Kontrolltieren und allen fünf Versuchstieren wurden die Tumoren in die Zellkultur überführt. Dafür wurde der Tumor in Zellkulturmedium vorsichtig zerkleinert und die Zellen normalen Zellkulturbedingungen zugeführt. Hierbei wurden 3 pBABE und 7 mTERT dominant-negativ enthaltende neue Tumorzelllinien generiert, welche mit pDN-T bzw. pBABE-T bezeichnet wurden.

3.2.12 Phosphorthioat-modifizierte Oligonukleotide zur Hemmung der Telomeraseaktivität

Synthetisch modifizierte Oligonukleotide wurden zur Hemmung der Telomerase in verschiedenen Zelllinien getestet. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Matthes vom Max-Delbrück-Zentrum Berlin-Buch durchgeführt. Dr. Matthes stellte freundlicherweise die phosphorthioat-modifizierten Oligonukleotide und ihre Sequenzen zur Verfügung.

Tabelle 3-3 Zur Hemmung der Telomerase konstruierte, chimäre, modifizierte Oligonukleotide PS= Phosphorthioat; PAM= Phosphoramidat; 11n= Nonsens-Sequenz; T11, T5, T6=telomerase-spezifisch; OCH₃=methylierte Phosphordiester; N= Phosphordiester; X= NH₂

	Name	Formel	5'-3' Sequenz
1	T 252	20nPS/11n/PAM	TCA-GAT-TAG-TAC-TCG-TCA-GA-TCA-GAT-ACA-GA
2	T 321	20nPS/T11/PAM-NH ₂	TCA-GAT-TAG-TAC-TCG-TCA-GA-GTT-AGG-GTT-AG
3	T 250	20nPS/T5/PAM	TCA-GAT-TAG-TAC-TCG-TCA-GA-GTT-AG
4	T 116	20nPS/X	TCA-GAT-TAG-TAC-TCG-TCA-GA-X
5	T 166	18nPS/N/T6 OCH ₃	TCA-GAT-TAG-GAC-TGC-TCA-G-AGU-UAG
6	T 319	20nPS/T11/OCH ₃	TCA-GAT-TAG-TAC-TCG-TCA-GA-GTT-AGG-GTT-AG
7	T 309	20nPS/T11/OCH ₃ /P3 PS	TCA-GAT-TAG-TAC-TCG-TCA-GA-GTT-AGG-GTT-AG

Die aufgeführten Oligonukleotiden sind an Proteinlysaten von Zelllinien auf Hemmung der Telomeraseaktivität getestet wurden. Dafür wurden 0,3 µg Protein 5 min lang mit jeweils 10, 50, 100 oder 500 nM Oligonukleotid inkubiert und anschließend der Nachweis der Telomeraseaktivität mit dem TRAP-Assay durchgeführt. Die Experimente wurden je Oligonukleotid und Zelllinien zweifach wiederholt.